转基因聚球藻 7942 中 *vp28* 基因表达效率及其光合特性分析

庄旻敏[1]，贾晓会[1，2]，施定基[3*]，朱嘉诚[1]，冯思豫[1]，何培民[1]，贾睿[1*]

1 上海海洋大学生态与环境学院，上海市　201306

2 北京师范大学生命科学学院 北京市 100875

3 中国科学院植物研究所，北京市 100093

摘　要：【背景】对虾白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus ,WSSV)是对虾养殖业中危害最严重的病毒之一，至今尚无规模应用的有效药物防治方法。但近年来在 WSSV 免疫防治上进展较大。Vp28 蛋白是 WSSV 囊膜上的主要结构蛋白，2004 年以来其编码基因已在 8 种宿主中表达成功，在实验室试验中对 WSSV 的防治疗效显著，但目前尚未见到其在对虾产业中的应用。【目的】利用对虾的天然饵料聚球藻表达 Vp28 重组蛋白，这种药食同源可简化操作，降低成本，有助其在生产中应用。【方法】用荧光定量 PCR 方法检测转 *vp28* 基因聚球藻 7942 中 *vp28* 基因的表达效率。通过氧电极的方法测得转 vp28 基因型聚球藻在不同温度、光照、pH 和盐度下的光合活性变化，找到它的最适生长条件。【结果】检测了 *vp28* 基因表达效率为 9.52%，是在鱼腥藻 7120 表达效率的三倍。最适采收时间是对数生长后期（15d 左右）。转基因型蓝藻 7942 的最适生长条件是：温度为 40 ℃，盐度为 0-0.1 mol Nacl /L，pH 为 7.5，光强 450 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$。【结论】本研究确定了 *vp28* 基因在聚球藻中的表达效率及该转基因藻的最适培养条件，这些研究结果为用转 *vp28* 基因型聚球藻 7942 规模制备药食同源的口服剂提供了依据。

关键词：转 *vp28* 基因聚球藻，光合活性，实时荧光定量 PCR，*vp28* 基因表达效率

Received: ; **Accepted:**

Supported by: Chinese Ministry of Science and Technology (863Program) (No. 2014AA093506), Shanghai Science and Technology Promotion project (2017) NO. 1-13, Shanghai Municipal Science and Technology Commission project (16391903500, 17391902200).

Corresponding author: SHI Ding-ji, E-mail: cyanoshi@163.com; JIA Rui.E-mail: rjia@shou.edu.cn;

基金中文名称 国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2014AA093506)，上海市科技兴农推广项目（沪农科推字（2017）第 1-13 号），上海市科委项目（16391903500, 17391902200）资助。

Vp28 gene expression and photosynthetic characteristics of transgenic *Synechococcus* sp. PCC 7942

ZHUANG Min-min [1], JIA Xiao-hui [1, 2], SHI Ding-ji [3*], ZHU Jia-cheng [1], FENG Si-yu [1], HE Pei-min [1*], JIA Rui [1*]

1 *School of ecology and environment Shanghai ocean university, Shanghai* 201306

2 *School of biosciences，Beijing Normal University，Beijing* 100875

3 *Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100093

Abstract: White spot syndrome virus (WSSV) is one of the most harmful viruses in the shrimp industry, and there has been no effective drug on mass scale up to now. In recent years, the immunological prevention of WSSV from shrimp has been progressed hopefully.Vp28 protein is the major structural component on the envelope of WSSV. Since 2004, its coding genes have been expressed in 8 species, and the control of WSSV has been proved remarkably in the laboratory. However, it has not been applied in shrimp industry yet. The shrimp bait, *Synechococcus* sp.PCC7942 was used as the acceptor to express *vp28* gene, and this homology of medicine and food may be helpful for its application in the shrimp industry. The expression efficiency of *vp28* in transgenic *Synechococcus* sp.PCC7942 has been detected by RT-qPCR method. And photosynthetic characteristics of transgenic *Synechococcus* sp.PCC7942 at different temperature, illumination, pH and salinity have been measured by the method of oxygen electrode. The expression efficiency of *vp28* gene was 9.52% which was three times higher than that of *Anabaena* sp. PCC 7120. The most suitable harvest time was in late logarithm growth (the 15th d). The optimum growth conditions of transgenic *Synechococcus* sp.PCC7942 were as follows: the temperature 40 ℃, the salinity 0-0.1 mol Nacl/L, pH 7.5, light intensity 450 μmol·m^{-2}·s^{-1}. These data may be useful for scale preparation of oral drug made from transgenic *Synechococcus* sp.PCC7942.

Keywords: Transgene *Synechococcus* with *vp28* gene, Photosynthetic activity, RT-PCR, Expression of *vp28* gene

白斑综合征病毒（White Spot Syndrome Virus ,WSSV）是一种致死性极高、传染性极强的对虾病原体[1]。20 年来，该病毒已经成为阻碍虾类养殖业发展的主要病害[2]，对虾一旦感染 WSSV 后，2-10d 内的积累死亡率可达 100%[3,4]。

Vp28 是 WSSV 囊膜上的主要结构蛋白。Van Hulten[5]等将 *vp28* 基因成功地克隆到杆状病毒的表达载体上，并在昆虫细胞中表达，由该系统表达的 Vp28 蛋白所制备的高浓度

的动物血清对于 WSSV 具有中和作用，这显示 Vp28 可能在 WSSV 感染宿主的过程中起着关键性的作用。在 WSSV 的防治中，接种疫苗的方法已经引起了较大的关注[6]，特别是对于重组 Vp28 囊膜蛋白的研究[7]。自 2004 年以来，已在 8 种微生物宿主中成功表达了 *vp28* 基因 [5]。尽管免疫方法疗效显著，但由于其操作复杂、成本高，虽已在实验室试验多年[8]，但尚未见其规模应用。

蓝藻（又名蓝细菌），是唯一的原核藻种群体，结构简单、生长迅速、适应性强、易于进行遗传实验上的操作，一些蓝藻成为了分子生物学和基因工程研究中常用的模式生物[9]。根据蓝藻可以作为虾苗的饵料的特点，张春莉等[10]首次将白斑综合征病毒囊膜蛋白 *vp28* 基因在鱼腥藻 7120 中成功表达，通过口服用药的方法来进行对虾白斑综合征病毒的防治更易于生产应用[11，12]。但 *vp28* 基因在其中的表达效率很低，远不能满足生产需求。如果能有效提高 *vp28* 基因的表达率，则可进一步降低成本从而真正实现口服剂的产业化。

虽然多年前已把 *vp28* 基因转入聚球藻 7942 中表达成功[11]，但由于它不易采收，所以构建好后未进一步分析其表达效率及其最适生长条件。由于目前已建立了单细胞藻的简易采收方法[13]，为转基因型聚球藻 7942 的规模培养提供了条件。本研究通过氧电极分析转基因型聚球藻光合速率及呼吸速率随环境因子的变化特征，测得其最适生长条件，并通过实时荧光定量 PCR 的方法分析不同生长时期其 *vp28* 基因表达效率及最适的采收时间。

聚球藻是对虾幼苗的天然饵料，使用转 *vp28* 基因聚球藻 7942 直接投喂对虾幼苗来防治 WSSV，可起到药食同源的作用，可促进该口服剂在对虾养殖产业中的应用！

1　材料与方法

1.1　材料

本研究所用的蓝藻藻种见表 1。

表 **1**　本研究用的蓝藻品系

Table 1　Cyanobacterial strains in this study

strain	antibiotic	features	source

Anabaena sp. PCC 7120		wild type	Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences
Empty vector type 7120	Neomycin	transferred pRL-489	
vp28 type 7120	Neomycin	Harboring *vp28* gene	
Synechococcus sp. PCC 7942		wild type	Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Tianjin University of Science &Technology
Empty vector type 7942	Kanamycin	transferred pRL-489	
vp28 type 7942	Kanamycin	Harboring *vp28* gene	

1.2 主要仪器和试剂

FTC-3000 实时荧光定量 PCR 系统(Canada Funglyn Biotech Inc 公司)，液相氧电极（英国 Hansatech 公司），总 RNA 提取试剂盒（天根生化科技有限公司），RNA 反转录试剂盒（天根生化科技有限公司），KAPA 通用型 SYBR 快速定量试剂盒（捷易生物有限公司），电泳凝胶回收试剂盒（天根生化科技有限公司），TAE 电泳缓冲液，硫酸卡那霉素，BG-11 培养液，分光光度计等。

1.3 方法

1.3.1 Western Blot 法检测目的蛋白

取转 *vp28* 基因型、空载体型和野生型聚球藻 7942 对数生长期样品(OD750=0.5),冻融多次离心去上清液，用 Bradford 方法测蛋白浓度后计算上样量，每个泳道保证约有 10μg 蛋白。蛋白质电泳后转膜，封闭，保证封闭时间后孵育单克隆抗体。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 方法的建立[14]

a) 引物设计。根据 GENBANK 上登记的对虾白斑综合征病毒核酸序列，设计一对 RT-PCR 的引物（表 2)），并以 WSSV 病毒 DNA 为模板扩增 *vp28* 基因，电泳分离、鉴定后对产物测序，以验证所选择的保守序列的正确性。b) 标准品的制备。通过 WSSV 的 DNA 作为调取 *vp28* 基因，取凝胶回收纯化后的 *vp28* 基因片段作标准品的标准品 DNA。浓度稀释 10 倍后，根据双链 DNA 浓度计算公式计算：DNA 浓度=50×$OD260$×

稀释倍数=ng/μl(1)，并根据拷贝数计算公式：Number of copies=(mass×6.022×10^{23})/(length×10^9×650) (2)，计算拷贝数确定稀释倍数。c) 反应体系的建立。20 μl 反应体系：SYBR Mix （2×）*: 10 μl; Forward Primer:0.4 μl; Reverse Primer: 0.4 μl; DNA 模板: 2 μl; PCR-grade water: 7.2 μl 反应条件见表 3。

表-2 ***vp28*** 引物序列

Table2 *vp28* primer sequence

Primer name	Primer sequence (5′–3′)	Size (bp)
vp28 Forward	AAGGATCCGGAGAGCGTCATGGATCTTTCTTTCAC	35
vp28 Reverse	CCCCCCGAATTCCACGATTTATTTACTCGGTCTC	34

表 **3** 实时荧光定量 **PCR** 反应条件

Table3 Real-time fluorescence quantitative PCR reaction conditions

stage	cycle	temperature	time	content	Fluorescence signal acquisition
Initial	1x	95℃	15min	Initial	No
PCR reaction	40x	95℃	10sec	Denaturation	No
		50-60℃	20sec	Annealing	No
		72℃	30sec	Extend	Yes

1.3.3 不同生育期转基因型聚球藻 *vp28* 基因表达效率分析

取不同生长时期的转基因型聚球藻样品，提取样品总 RNA，并反转录成 cDNA，进行 RT-qPCR 扩增。将 Ct 值通过标准曲线计算 log 拷贝数的值，通过公式 2 计算样品拷贝数和样品 DNA 浓度，并以聚球藻干重为底计算百分比含量和蛋白含量[12]。

1.3.4 聚球藻的培养

使用 BG-11（+N/-N）培养基，在 35 ℃，持续光照（50 μmol photons $m^{-2}s^{-1}$）[15]，135 r/min 下振荡培养。

1.3.5 聚球藻的生理活性检测

a）生长曲线的测定。每隔 24 h 取样，测定周期大致在 16-20d，进行两种观察：(1) 血球计数板计细胞数 (2)测定 OD750 值 b)液相氧电极对光合放氧活性的测定[16]。取对数期藻细胞，把上样样品叶绿素浓度调至 10 μg/ml，用氧电极测定转基因型、空载体型与野生型聚球藻 7942 在不同光照、温度、盐度、pH 下的净光合放氧。按下式计算放氧活

性：V=S*K*60*1000/P（3）。（V：放氧活性 μmolO_2/mgChl·hr；S：斜率 min^{-1}；K:常数，表示一定温度下水中的溶氧量 μmolO^2/ml；P:叶绿素浓度 mgChl/ml。）取藻样 4000 r/min 离心 10 min，去除上清液。加入 90％甲醇充分混匀，在室温下萃取 2h，在 4 ℃下 8h，4 000 r/min 离心 10 min 取上清，测定 OD665 吸光值。根据公式计算样品中叶绿素的含量[17]：Chl (μg/ml) = 13.9* OD665（4）。

2 实验结果

2.1 聚球藻7942 中Vp28 蛋白测定

转 *vp28* 基因型聚球藻 7942 早在 2006 年构建成功，在液相和固相中继代培养，为检测其中 *vp28* 基因是否还稳定存在聚球藻 7942 细胞中，使用 western blot 方法进行检测。提取培养至对数期的野生型、空载体型及转 *vp28* 型聚球藻 7942 细胞中的可溶性蛋白，用 Bradford 法测定 3 种藻的蛋白浓度，确定蛋白电泳的上样量。Western blot 结果显示：野生型、空载体型中没有 Vp28 蛋白表达，而转基因型藻中有 Vp28 条带出现（图 1），且与标准品蛋白条带位置一致。这证明，Vp28 蛋白在转基因型聚球藻中稳定表达。

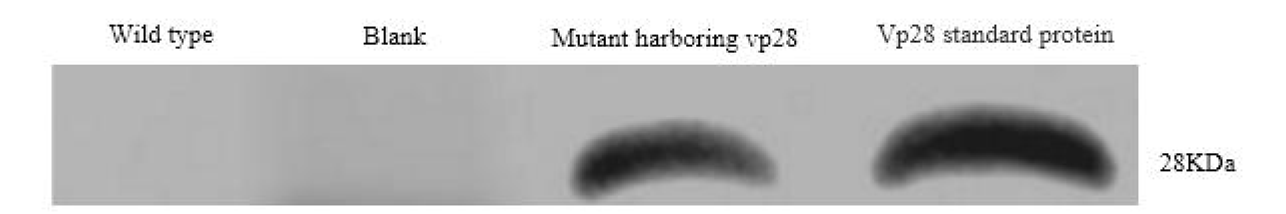


图 **1** 聚球藻 7942 野生型、转空载体型及转 *vp28* 基因型中 Vp28 蛋白的蛋白印迹

Fig. 1 Western blot of Vp28 from the wild type, blank, and transgenic type of *Synechococcus* 7942

2.2 实时荧光定量 PCR 标准曲线

定性检测 *vp28* 基因的表达产物存在后，采用 RT-qPCR 方法进一步定量分析 *vp28* 基因在其生长期的表达效率。

2.2.1 引物的扩增及其熔解曲线

以 WSSV 病毒 DNA 作为模板，使用引物（表 2）进行扩增，使用 3%的琼脂糖凝胶电泳检测，凝胶电泳成像。由图 2 可知该反应扩增出了 164 bp 的 DNA 特异性条带,且使

用标准品 DNA 进行定量荧光 PCR，对其扩增产物作熔解曲线时，只有一个特异性吸收峰，熔解温度为 81 ℃。结果验证 RT-PCR 引物特异性良好。

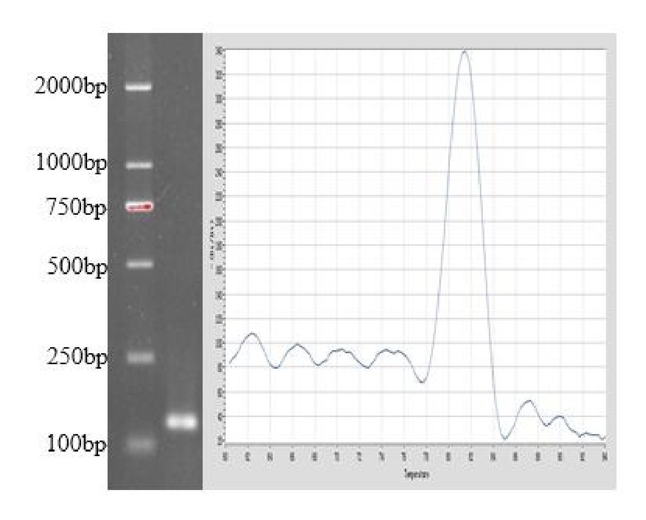


图 2　*vp28* 基因的 PCR 产物用 3%的琼脂糖凝胶电泳检测及纯化后 *vp28* 基因的熔解曲线

Fig. 2　Agarose gel electropherogram of *vp28* PCR and melting curve of purified *vp28* gene

2.2.2　标准品模板与标准曲线绘制

在实时荧光定量 PCR 检测过程中，将扩增的 *vp28* 基因模板通过电泳凝胶回收。切取纯 *vp28* 基因凝胶，再通过 10 倍梯度逐级稀释后，通过 PCR 进行扩增。如图 3 所示，得标准曲线。标准品的初始拷贝数为 7.98×10^{13} copies/μl。

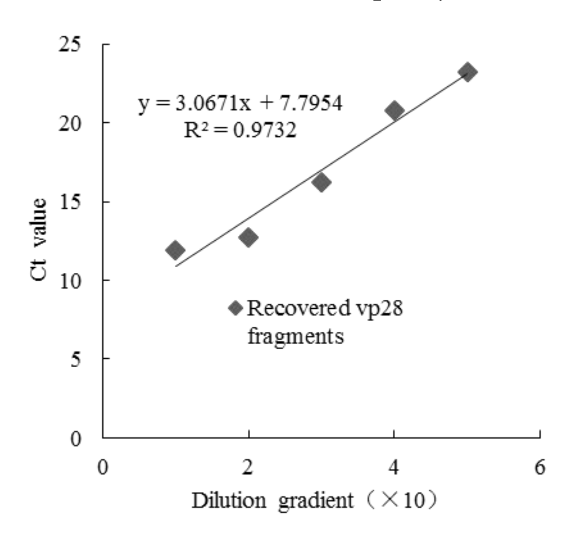


图 3　回收的纯的 *vp28* 片段标准曲线图

Fig. 3　Standard curve of recovered pure *vp28* fragment

2.3 转基因型聚球藻 7942 及鱼腥藻 7120 中 *vp28* 基因表达效率

取接种后 3、6、9、12、15、18d 的转 *vp28* 基因型聚球藻，分析其不同生长时期 *vp28* 基因表达效率。由此得到不同生长时期转 *vp28* 基因型聚球藻 Ct 值及拷贝数数据（表 4），以及 RT-PCR 绝对定量表达效率（图 4）。此外，还将 *vp28* 基因在转基因型聚球藻 7942 中和转基因型鱼腥藻 7120 中表达效率（表 5 和图 5）进行了比较。由转基因型聚球藻的生长曲线得出该藻生长规律（图 7 和 8）：1-3d 为延滞期，4-14d 为对数生长期，15d 进入稳定期。由图 4 可知，在转 *vp28* 基因型聚球藻进入对数生长后期时，Vp28 蛋白的产率可达 318mg/L，*vp28* 基因在转基因型聚球藻（干重）中的表达效率最高，可达 9.52%。在转基因型鱼腥藻 7120 中（干重）*vp28* 基因在对数生长中期时表达效率最高，Vp28 蛋白的产率可达 108mg/L，表达效率为 3.23%。*vp28* 基因在转基因型聚球藻 7942 中的表达效率是转基因型鱼腥藻 7120 中的三倍。

表 **4** 不同生育期转 ***vp28*** 基因型聚球藻 **7942** 的 **Ct** 值及拷贝数

Table 2-1 Ct value and copy number of *vp28* gene in transgenice *Synechococcus* 7942 at different growth stages

Growth times	3	6	9	12	15	18
Average Ct value	21.03	21.92	19.17	19.99	17.84	20.62
Average copy number（copies/ml）	38642	19810	156136	84362	423779	52570

表 **5** 不同生育期转 ***vp28*** 基因型鱼腥藻 **7120** 的 **Ct** 值及拷贝数

Table 2-2 Ct value and copy number of *vp28* gene in transgenice *Anabaena* 7120 at different growth stages

Growth times	3	6	9	12	15	18
Average Ct	21.65	22.88	20.32	19.28	20.62	20.87
Average copy number（copies/ml）	24261	9635	65850	143760	52570	43574

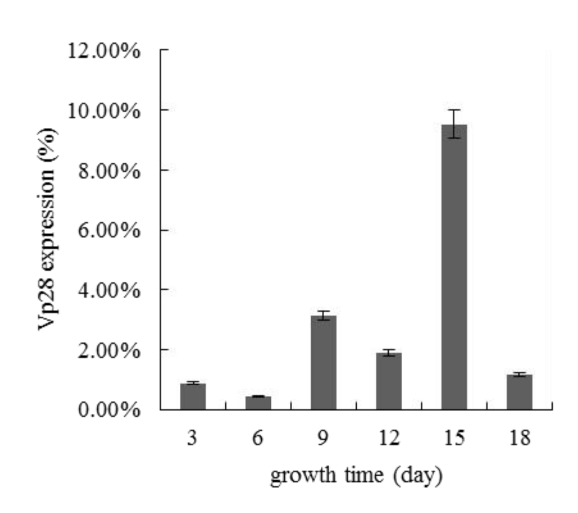


图 **4**　不同生长时期转基因型聚球藻 7942 *vp28* 基因的表达效率

Fig. 4　*vp28* gene expression rates of transgenic *Synechococcus* 7942 during different growth stages

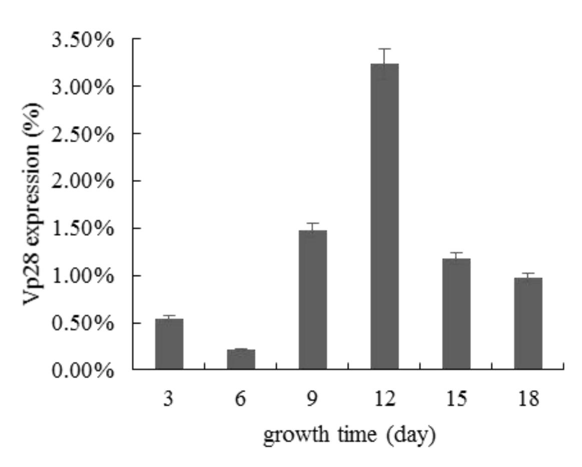


图 **5**　不同生长时期转基因型鱼腥藻 7120 *vp28* 基因的表达效率

Fig. 5　*vp28* gene expression rates of transgenic *Anabaena* 7120 during different growth stages

2.4　转基因型聚球藻 7942 的光合和生长

从上述结果可知，聚球藻 7942 中 *vp28* 基因表达效率较高，开发该藻作为口服剂可降低成本。为对该藻进行规模培养，我们检测了它的最适生长条件。

2.4.1　光强、pH、温度和盐度对转 *vp28* 基因型聚球藻 7942 光合作用的影响，以及最适生长条件的探究

图 6a 是 35 ℃下转 *vp28* 基因型聚球藻 7942、空载体型与野生型的光合作用光强曲线。野生型的光补偿点在 15 μmol·m^{-2}·s^{-1}，光饱和点在 300 μmol·m^{-2}·s^{-1}，净光合速率为 56.3μmol photons m^{-2} s^{-1}。空载体型 7942 和转 *vp28* 型 7942 的光饱和点在 600 μmol·m^{-2}·s

-1 左右，此时的净光合速率分别为 60.8 和 64.3μmol photons m^{-2} s^{-1}。这三种细胞型的聚球藻 7942 在光强达到 700-900 μmol·m^{-2}·s^{-1} 时，出现光抑制现象。转 *vp28* 基因型聚球藻 7942 和空载体型比野生型光饱和点升高，净光合比野生型高 14.2%。

由图 6b 可见野生型藻最适 pH 在 8.0，而转空载体型藻和转 *vp28* 基因的藻最适 pH 为 7.5。转基因型藻在 pH 上升到 7.5 以前光合作用速率一直在提升，之后便开始下降，在 pH 达到 9.0 时仍然测得光合作用速率。转空载体型藻与转基因型蓝藻的特点相类似，但是对于 pH 值稍微高于最适时，净光合速率明显下降。

从图 6c 可见，空载体型和转基因型藻在温度的响应上与野生型藻基本保持一致。在 40 ℃生长最快，可见 45 ℃的高温对转基因型、空载体型藻和野生型藻的生长都具有抑制作用，甚至可以使藻种失活。但是对图表的纵向对比可以发现野生型藻在高温的时候光合作用速率下降快于空载体型和转基因型藻。总之，对于温度的响应，转基因型藻的规律与野生型藻趋于一致，因此对于转基因型聚球藻 7942 最适的培养温度也在 40 ℃左右。

由图 6d 可以看出盐度高于 0.1 mol NaCl/L 后转基因型聚球藻 7942 对于高盐度的抗性最高，其次是野生型 7942，而空载体型 7942 对高盐度的抗性略差。野生型和转基因型在 NaCl 浓度为 0 mol/L 时生长最佳，而空载体型在 NaCl 浓度为 0-0.1 mol/L 时生长最佳。不论野生型、空载体型还是转基因型对于低盐度的变化对光合作用速率的影响比高盐度变化明显。基于以上，转 *vp28* 基因型聚球藻 7942 培养的盐度应该控制在 0-0.1 mol/L NaCl。

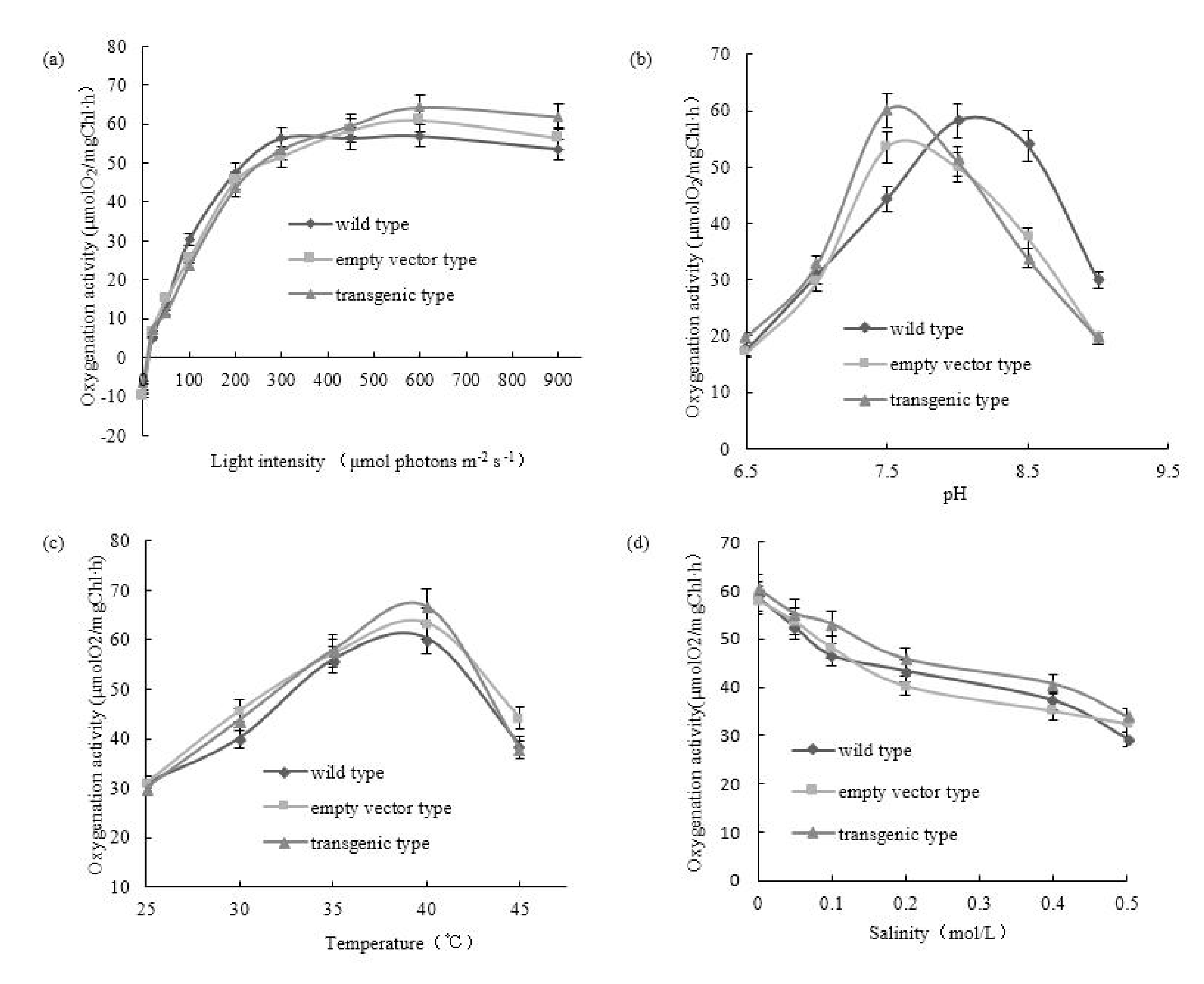


图 **6** 聚球藻 7942 野生型与空载体型、转 *vp28* 型的光合对环境因子响应曲线： a 光合-光强曲线, b 光合-**pH** 曲线, c 光合-温度曲线, d 光合-盐度曲线图

Fig.6 The responses of photosynthesis in the wild type and mutants of *Synechococcus sp.*7942 to environmental: a photosynthesis-light curves, b photosynthesis - pH curves, c photosynthesis - temperature curves, d photosynthesis - salinity curves

2.4.2 不同生长时期聚球藻 7942 的生长

通过图 7 和图 8 可以看出转 *vp28* 基因型、转入空载体型和野生型聚球藻 7942 的对数生长期都在第 4-14d。由此可看出导入空载体对于聚球藻 7942 的生长略有促进作用，转入 *vp28* 基因对聚球藻 7942 的生长促进作用更大，生长率最大可提高 15.4%,这与光强曲线的结果一致。

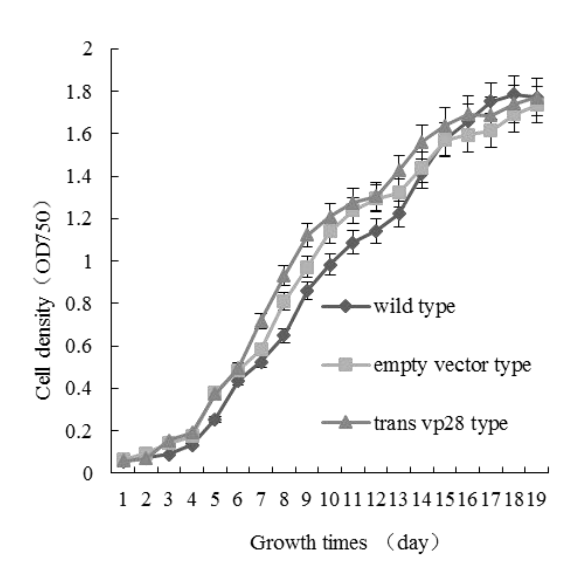


图 **7** 聚球藻 7942 野生型、空载体型和转 *vp28* 基因型的生长曲线（用分光光度计在 ***OD***750 检测）

Fig7 Growth curves of wild type, empty vector type and transgenic type in *Synechococcus sp.*7942 type（detected at *OD*750 of spectro photo meter）

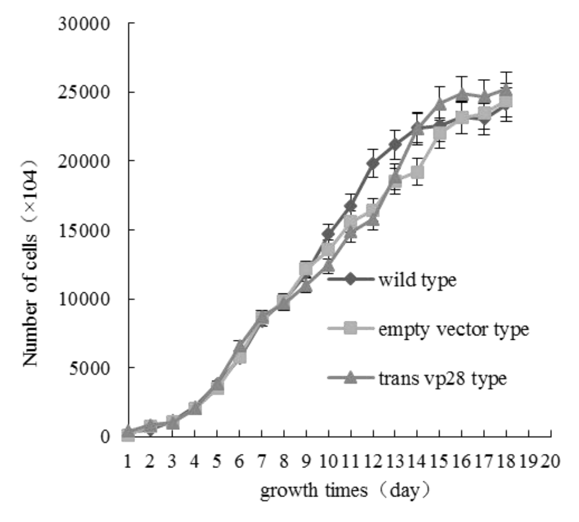


图 **8** 聚球藻 7942 野生型、空载体型和转 *vp28* 基因型的生长曲线（用血球计数板在光学显微镜下检测）

Fig8 Growth curves of wild type, empty vector type and transgenic type of *Synechococcus sp.*7942

3 结果与讨论

本研究是基于 WSSV 病毒囊膜蛋白基因 *vp28* 在聚球藻中表达成功[11]的基础上进行的，虽然经过九年继代培养，*vp28* 基因仍能在聚球藻 7942 体内稳定存在并表达。研究表明在转 *vp28* 基因型聚球藻进入对数生长后期时，Vp28 蛋白的表达量可达 318mg/L，

聚球藻 *vp28* 基因的表达效率为 9.52%，是目前已报道 *vp28* 基因在鱼腥藻内表达效率为 1%[18]的十倍。目前还没有 *vp28* 基因在聚球藻 7942 中不同生长时期表达效率的变化检测的相关研究。

同时针对不同环境条件（光照、温度、盐度及 pH）下，对转基因型聚球藻生理活性进行检测分析，确定转 *vp28* 基因型聚球藻的最适生长条件：最适生长温度为 40 ℃，对于温度的响应，转基因型藻的规律与野生型藻趋于一致，但是也出现了一些耐高温的特性；最适盐度为 0-0.1 mol Nacl /L，低盐度的变化对光合作用速率的影响比高盐度变化明显；最适 pH 为 7.5，转基因型藻对 pH 的适应性没有野生型藻好；最适光强为 600 μmol·m^{-2}·s^{-1}，转 *vp28* 基因型聚球藻 7942 对光的耐受性相较于野生型和空载体型更高，在最适光强时，转基因型藻比野生型的净光合提高了 14.2%。

通过定量检测 *vp28* 基因在聚球藻 7942 不同生长期中的表达，不但为该藻的适宜采收时间提供依据，还可为对虾攻毒实验中用药的剂量以及定量的分析打下基础。规模培养需调控光照、温度、pH 和盐度等主要环境因子来促进转基因型聚球藻 7942 快速生长，生理特性的检测为此提供了依据。

蓝藻是对虾幼期的一种天然饵料，构建转 *vp28* 基因型蓝藻的目的是发挥其药食同源的优势，制备易操作、成本低的抗 WSSV 的口服剂并真正实现其产业化。

致谢： 感谢中国科学院植物研究所施定基教授、上海海洋大学何培民教授和贾睿副教授提供的技术支持与指导，上海海洋大学生态与环境学院贾睿老师课题组提供的仪器耗材支持。上海海洋大学朱嘉诚和冯思豫等同学为本研究付出了艰苦努力，在此表示衷心感谢！

REFERENCES

[1] Research advance of immunology prevention of shrimp white spot syndrome virus. Marine Fisheries , 2016, 38(4): 437-448
何培民，郭媛媛，贾晓会，等.对虾白斑综合征病毒免疫防治研究进展. 海洋渔业, 2016, 38(4): 437-448.

[2] Nunan LM, Lightner DV. Optimized PCR assay for detection of white spot syndrome virus (WSSV). Journal of Virological Methods, 2011, 171(1): 318-321.

[3] Inouye K, Miwa S, Oseko N, Nakano H, et al. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp Penaeusjaponicus in

Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. Fish Pathology, 1994, 29(2): 149–158.

[4] Seibert, CH, Pinto.AR. Challenges in shrimp aquaculture due to viral diseases: distribution and biology of the five major penaeid viruses and interventions to avoid viral incidence and dispersion. Brazilian Journal of Microbiology, 2012, 43(3): 857-864.

[5] Van Hulten M C, Witteveldt J, Snippe M, et al. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. Virology, 2001, 285(2): 228-233

[6] Sánchiez-Paz A. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. Veterinary Research, 2010, 41(6):41-43.

[7] Mu Y, Lan J, Zhang X, et al. Avector that expresses VP28 of WSSV can protect red swamp crayfish from white spot disease. Developmental and Comparative Immunology, 2012, 36(2): 442-449.

[8] Ma XY, Li P, Yan J, et al. A Review on Shrimp White Spot Syndrome Virus. Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition), 2012, 35(4): 90-100.
马晓燕，李鹏，严洁，等.对虾白斑综合症病毒的概述. 南京师大学报(自然科学版), 2012,(4): 90-100.

[9] Richard W, Castenhol Z. Culturing methods for cyanobacteria. Methods in Enzymol, 1988, 167(3): 68-95.

[10] Zhang CL, Shi DJ, Huang J, et al. Clone of envelope protein VP28 gene of white spot syndrome virus (WSSV) and expression vector construction for cyanobacteria. Marine Sciences, 2003, 27(2): 72-76.
张春莉, 施定基, 黄倢, 等.白斑综合征病毒(WSSV)囊膜蛋白 vp28 基因的克隆及在蓝藻中表达载体的构建. 海洋科学, 2003, 27(2): 72-76.

[11] Deng YG, Hou LJ, Deng LZ, et al. Expression and Analysis of the WSSV VP28 Gene in *Synechococcus*. Journal of Tianjin University of Science ＆ Technology, 2008; 23(1): 29-32.
邓元告, 侯李君, 邓丽珍, 等. 对虾白斑病毒 VP28 基因在聚球藻中的表达与分析.天津科技大学学报, 2008, 23(1): 29-33.

[12] Jia XH, Zhang CL, Shi DJ, et al. Oral administration of *Anabaena*-expressed VP28 for both drug and food against white spot syndrome virus in shrimp. Journal of Applied Phycology, 2016, 28(2): 1001-1009.

[13] Sun YH, Zhang ZY, Shi DJ, et al. A sterile collection method for *Synechococcus*: Chin, C12N1/12; |C12R1/89. 2015.03.09
孙溢华, 张正阳, 施定基, 等. 一种聚球藻的无菌收集方法: C12N1/12; |C12R1/89. 2015.03.09

[14] Mendozacano F, Sanchezpaz A. Development and validation of a quantitative real-time polymerase chain assay for universal detection of the White Spot Syndrome Virus in marine crustaceans. Virology Journal, 2013, 10(1): 186-186.

[15] Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M, et al. Purificationand properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). Bacteriological Reviews, 1971, 35(2): 171–205

[16] Shi DJ. Energy metabolism and structure of immobilized cyano-bacterium *Anabaena* azollae. [D] London, King's College, 1987.

[17] Shi DJ, Zhou GF, Fang ZX, et al. Studies on photosynthesis, respiration and morphology of Nostoc Flagelliforme. Acta Botanica Sinica, 1992, 34(7):507-514.
施定基, 周国飞, 方昭希, 等.发菜的光合作用、呼吸作用和形态学的研究. 植物学报, 1992, 34(7):507-514.